Zur Umwandlung von Lignin in Humusstoffe

Von Wolfgang Flaig, Braunschweig

(Institut für Biochemie des Bodens der Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig-Völkenrode)

Bei Untersuchungen über die Humifizierung abgestorbener Pflanzen ist schon mehrfach die verhältnismäßig langsam verlaufende Zersetzung von Lignin festgestellt worden. Es sind jedoch kaum Ergebnisse bekannt, die die Veränderungen des Lignins während der Rotte betreffen. In diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen von F. E. Broadbent [1] zu erwähnen. Die Vorgänge bei der Humifizierung von Stroh sind von uns als Beispiel herausgegriffen worden und können sinngemäß auch auf andere Rückstände pflanzlicher Herkunft übertragen werden. Je nach dem Pflanzenbestand fallen verschiedenartige Rückstände an, deren Humifizierung im Prinzip in der gleichen Weise abläuft. Die Unterschiede in den Mengenverhältnissen der Bestandteile während der Rotte, die verschieden rasche Zersetzung und in manchen Fällen auch besondere Eigenschaften der Rotteprodukte sind neben den äußeren Bedingungen auch auf die Mengenverhältnisse der einzelnen Komponenten des pflanzlichen Ausgangsmaterials zurückzuführen. Diese Probleme sind noch nicht bis in alle Einzelheiten untersucht.

Bei der weiteren Zersetzung von Torf und jungen Braunkohlen mit Stickstoffgaben treffen nach unseren Erfahrungen diese erwähnten Gesichtspunkte zu [2]. In diesen Fällen geht man allerdings von pflanzlichen Rückständen aus, bei denen die Zersetzung des Ausgangsmaterials schon weit fortgeschritten, und bei denen das Lignin ebenfalls schon verschiedenen chemischen Veränderungen unterworfen ist. Nach den bisherigen Erkenntnissen sind die Unterschiede bei der Zersetzung pflanzlicher Rückstände mehr gradueller als prinzipieller Art, wenn sie unter den gleichen Bedingungen erfolgt.

Uns erschien die Mitwirkung der Mikroorganismen des Bodens bei der Untersuchung der Zersetzung des Strohs wesentlich. Das auf 3—5 cm gehäckselte Stroh ist mit einem Bodenauszug versetzt worden. Um vergleichbare Bedingungen für die verschiedenen Untersuchungen herzustellen, ist die Verrottung des Strohs in Klimaräumen bei 90%iger Luftfeuchtigkeit und bei 30 °C vorgenommen worden. Den Ansätzen ist zu je 10 kg getrocknetem Stroh eine Nährlösung der folgenden Zusammensetzung zugegeben worden:

73,41 g KH_2PO_4
15,52 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
9,31 g KCl
25 l H_2O (pH 4,3)

Tabelle 1. Zugesetzte Menge an Stickstoffsalzen (10 kg)

Weizenstroh	Roggenstroh			
$NaNO_3$	NH_4NO_3			
	0 g		124.18 g 124,18 g (nach 28 Tagen)	
280.5 g	0 g	124.18	248.36 g	
0,5%	0%	0,5%	1.0%	% N pro Trockensubstanz
Abkürzungen bei den Versuchen				
$NaNO_3$	0 N	1 N	2 N	

Aus der zusammenfassenden Tabelle geht auch die jeweils angewandte Menge und die Art der Stickstoffquelle hervor.

Die Auftrennung der Rotteprodukte in ihre Einzelbestandteile (Bild 1) erfolgte in Anlehnung an die Methode der annähernden Bestimmung der Pflanzenbestandteile nach S. A. Waksman [3]. Hierbei muß auf die besonders sorgfältige Isolierung der Ligninfraktionen hingewiesen werden; die Schwefelgehalte waren bei den Versuchen 0 N, 1 N, 2 N im Durchschnitt 0,68%, so daß der Schwefelgehalt keinen bemerkenswerten Einfluß auf die Elementaranalysen hatte. Die ermittelte Zusammensetzung an C, H, O, N und OCH_3 gab daher einen guten Überblick über die Veränderung der Ligninfraktionen im Verlauf der Rotte. Die Korrektur bei der Holozellulose auf Asche, Lignin und Protein ist erforderlich; mit zunehmender Rottezeit nehmen diese Verunreinigungen der Holozellulose zu. Die Differenz der Mengen an

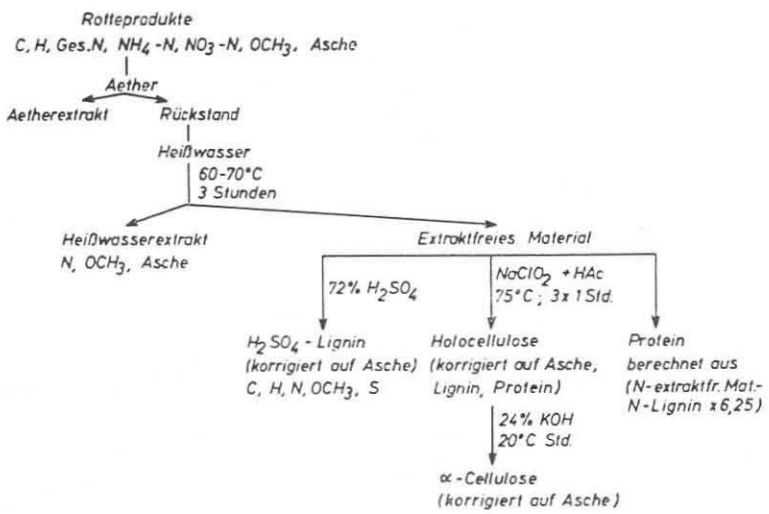

Bild 1. Schema der Auftrennung der Rotteprodukte

Lignin im extraktfreien Material liegt in den jeweiligen Rottestufen fast in allen Fällen und die an Holozellulose immer außerhalb der Fehlergrenze. Dies trifft auch für die Mengen an α-Zellulose zu.

Bei dem Analysengang werden die Rückstände der Extrakte mit Aether und die mit heißem Wasser, die Mengen an Lignin und die an Holozellulose durch Wägung bestimmt. Lignin und Holozellulose werden in dem extraktfreien Material bestimmt. Der Stickstoffgehalt im extraktfreien Material ist zur Bestimmung stickstoffhaltiger Anteile in den Rottesubstanzen herangezogen worden. Diese bestehen in überwiegender Menge aus Bakterieneiweiß. Zur Erfassung des Proteins ist der Stickstoffgehalt des extraktfreien Materials zu den verschiedenen Rottezeiten abzüglich der Stickstoffmengen der jeweiligen Ligninfraktionen mit dem Faktor 6,25 multipliziert worden. Diese Maßnahme ist nicht völlig korrekt, da noch andere stickstoffhaltige Verbindungen in diesem Material vorliegen, deren Zusammensetzung von der von Protein verschieden ist. Hierbei sei nur das Chitin der Pilzmyzele erwähnt. Ferner ist dabei der in den Ligninfraktionen möglicherweise als Protein vorliegende Stickstoff nicht in dieser Zahl erfaßt.

Mit dem beschriebenen Analysengang erfaßt man über die Summe von Lignin, Holozellulose, Aether- und Wasserextrakt und berechnetem Protein im Durchschnitt 96—98% des Ausgangsmaterials. Der prozentuale Gehalt an Holozellulose nimmt stark ab, während der an Ligninfraktionen zunimmt (Bild 2).

Die Geschwindigkeit der Zersetzung ist bei der gleichen Art der Stickstoffquelle von deren Menge abhängig.

Zieht man in gewissen Zeitabständen aus den Rotteansätzen Proben und unterwirft sie der Analyse nach dem oben erwähnten Schema, so stellt man fest, daß

1. sich die Mengen an den ausgewogenen Heißwasserextrakten und dem berechneten Protein im Verlaufe der Rottezeit nicht stark ändern, während die Holozellulose sehr rasch, und das Lignin verhältnismäßig langsam abgebaut werden;
2. mit der Menge an zugesetzten Stickstoffsalzen die Geschwindigkeit der Zersetzung zunimmt;
3. die Art der Stickstoffquelle, ob Natriumnitrat [4] oder Ammoniumnitrat, nahezu gleichen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Abnahme der organischen Substanz haben; die Menge des mit den Salzen zugegebenen Stickstoffs hat einen stärkeren Einfluß auf die Geschwindigkeit der Zersetzung als die unterschiedliche Art.

Die Feststellung der Abnahme der Mengen an organischer Substanz ist nicht ausreichend, um auf deren chemische Veränderungen Rückschlüsse ziehen zu können. Als Beispiel für die chemische Veränderung wird der Versuch 2 N (1% Ammoniumnitrat) angeführt (Bild 3).

Aus den Elementaranalysen der zu verschiedenen Zeiten entnommenen Proben ist zu ersehen, daß sich der Wasserstoffgehalt kaum ändert, während der Kohlenstoffgehalt zu- und der Sauerstoffgehalt abnimmt.

Aus den Elementaranalysen lassen sich die Mengen in Gramm an Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff errechnen, die in dem jeweiligen Rotteprodukt vorhanden sind. Am Ende der Rotte sind nur ca. $^1/_5$ von diesen Elementen in Gramm vorhanden. Rechnet man die Mengen von Wasserstoff, Sauerstoff und Kohlenstoff in Gramm-

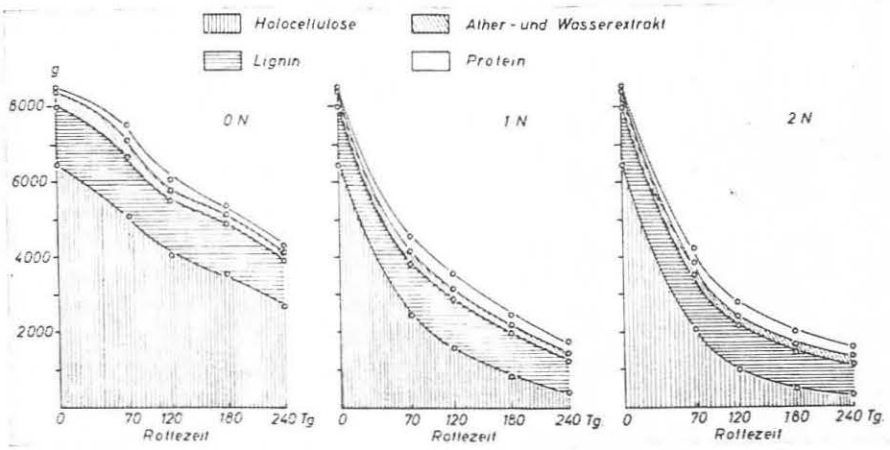

Bild 2. Zusammensetzung der organischen Substanz von Roggenstroh in den einzelnen Rottestufen in Gramm

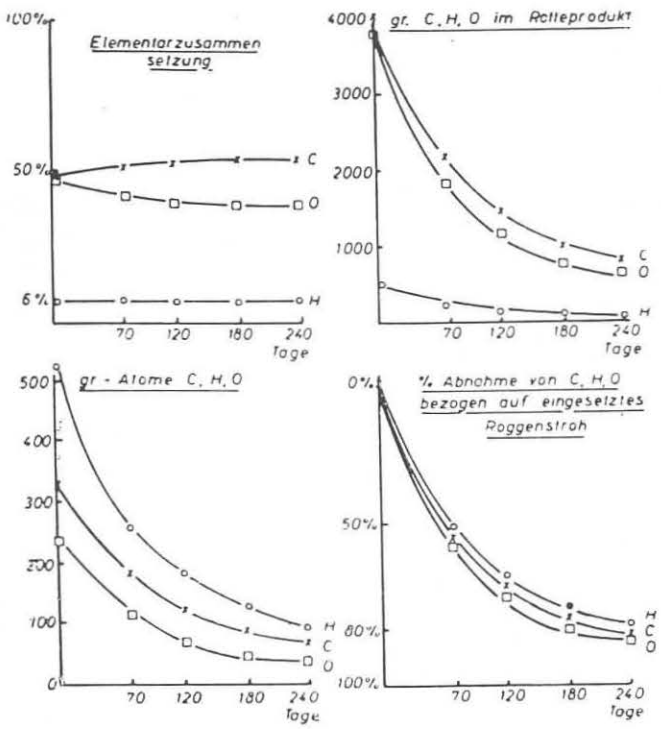

Bild 3. Veränderungen der Rotteprodukte von Stroh bei Zusatz von 1% N als Ammoniumnitrat (2 N) im Verlaufe der Zeit

Atomen, so ergibt sich, daß das Verhältnis von Kohlenstoff zu Sauerstoff sich nach 70 Tagen etwas verengt hat und dann während der Rottezeit weitgehend konstant bleibt. Auf 6 Kohlenstoff-Atome kommen im Ausgangsmaterial 4,3 Sauerstoff-atome, in den Rotteprodukten ungefähr 3,3 Sauerstoff-Atome. Das Verhältnis von Kohlenstoff zu Wasserstoff nimmt von anfänglich 6 zu 9,5 mit der Rottezeit auf 6 zu 7,9 ab.

Die auf das Ausgangsstroh bezogene prozentuale Abnahme der Elemente Kohlenstoff und Wasserstoff verläuft fast in der gleichen Weise, während die von Sauerstoff nach 70 Tagen etwas ansteigt, um dann wieder geringer zu werden.

Die Geschwindigkeit der Abnahme der Substanz ist von der Menge an zugesetzten bzw. auch in dem pflanzlichen Material vorhandenen Stickstoffverbindungen abhängig. Dabei ist die Menge nicht ausschließlich maßgebend, sondern die Verwertbarkeit der Stickstoffverbindungen durch die an der Zersetzung des Strohs beteiligten Mikroorganismen.

Die Beispiele 0 N, 1 N und 2 N sind so ausgewählt, daß sie in bezug auf den Einfluß der Stickstoffmenge einige Aussagen über die bei der Zersetzung ablaufenden Vorgänge erlauben. Ohne Zusatz von Stickstoff verläuft, wie auch in der Praxis zu beobachten ist, die Verrottung von Stroh langsam. In der Praxis werden im Durchschnitt 0,35 bis 0,5 % N pro Strohtrockengewicht angewandt. 1 % N ist demnach schon eine Überdosierung, bei der Verluste an Stickstoff auftreten.

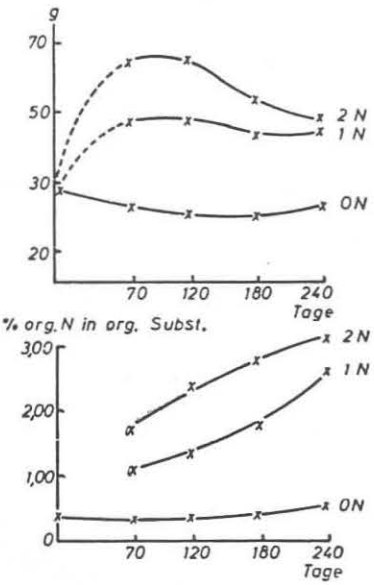

Bild 4. Mengen des organisch gebundenen Stickstoffs der einzelnen Rotteprodukte in Gramm und in Prozent

Aus dem oberen Teil des Bildes 4 kann man schließen, daß ein großer Teil des Stickstoffs bei der Gabe von 1 % N (2 N) des Strohtrockengewichtes während der starken Zersetzung der Holozellulose am Anfang der Rotte von den Mikroorganismen verwertet und in deren Körpersubstanz festgelegt wird. Ist die Holozellulose schon weitgehend abgebaut, z. B. im Falle von 2 N nach 120 Tagen bis auf 15%, so tritt in zunehmendem Maße eine Abnahme des organisch gebundenen Stickstoffs auf. Bei der Gabe von 0,5% (1 N) ist dies nicht so sehr der Fall. Der prozentuale Gehalt an Stickstoff in den Rotteprodukten steigt bei beiden Stickstoffgaben (1 N und 2 N) stetig an. Sowohl die Mengen in Gramm als auch in Prozenten scheinen sich im Laufe der Zeit einem Endwert zu nähern. Dies trifft auch bei dem Versuch mit Natriumnitrat zu, der über eine längere Zeit gelaufen und hier nicht aufgeführt ist [4].

Bei dem Versuch ohne Stickstoffzusatz (0 N) tritt mit der Zeit nur ein schwacher Gewichtsverlust an Stickstoff ein. In diesem Versuch verringert sich die organische Substanz auf die Hälfte, bei den beiden Versuchen mit 1 N und 2 N auf $^1/_5$. Da bei 0 N nur geringe Stickstoffverluste auftreten und das Ausgangsmaterial nur zur Hälfte abnimmt, steigt der prozentuale Gehalt an Stickstoff in der organischen

Substanz nur schwach an. Auf einige Beziehungen zwischen dem Gehalt am gesamten organischen Stickstoff und dem in den Ligninfraktionen soll später noch hingewiesen werden.

Im Zusammenhang mit der gezogenen Bilanz der Versuche und der Umwandlung der Bestandteile Lignin und Zellulose im Stroh interessieren noch einige der Ergebnisse der Untersuchungen an den Extrakten mit heißem Wasser. Bei der Versuchsanstellung ohne Stickstoffgabe (0 N) betragen die organischen Anteile des Heißwasserextraktes 4%, bei den mit den beiden Stickstoffgaben 0,5% und 1% (1 N und 2 N) im Durchschnitt 7%. Diese prozentualen Mengen sind unabhängig von der Rottezeit.

Das heißt, nehmen die mit der Zeit noch vorhandenen Mengen an Rotteprodukten ab, so nehmen die in den Zeitintervallen gebildeten in heißem Wasser löslichen Substanzen in gleichem Verhältnis ab. Diese Tatsache ist insofern bemerkenswert, als zu Beginn der Verrottung des Strohs zunächst große Mengen an Zellulose und später erst Lignin abgebaut werden. Es müssen demnach bei Beginn in der Hauptsache andere Mikroorganismen am Abbau beteiligt sein als gegen Ende; dieser Befund ist auch von mikrobiologischer Seite festgestellt worden. In den Extrakten mit heißem Wasser sind auf Grund des Methoxylgehaltes und des Gehaltes an organisch gebundenem Stickstoff beachtliche Mengen an Ligninabbauprodukten sowie Aminosäuren oder wasserlösliche Peptide vorhanden.

Nach Berechnungen der vorliegenden Analysen beträgt bei den Versuchsanstellungen 0 N und 1 N gegen Ende der Rotte der Gehalt an Aminosäuren 3% und der an Ligninabbauprodukten, die noch eine Methoxylgruppe tragen, ca. 30% des organischen Anteils des Heißwasserextraktes. Wie mit papierchromatographischen Methoden [5] nachgewiesen worden ist, befinden sich unter den Ligninabbauprodukten auch solche, die keine Methoxylgruppen besitzen, wie z. B. p-Hydroxybenzaldehyd; die Gesamtmenge an Ligninabbauprodukten muß demnach noch höher sein. Bei der höheren Stickstoffgabe (2 N) ist der Gehalt an Aminosäuren oder wasserlöslichen Peptiden beachtlich höher und dürfte gegen Ende der Rotte ungefähr 25 bis 30% betragen, während der Gehalt an Ligninabbauprodukten mit Methoxylgruppen nur ca. 7% ist. Die freien Aminosäuren in den Heißwasserextrakten sind papierchromatographisch untersucht worden. In allen Fällen wurden die gleichen gefunden [6].

Diese Untersuchungen sind jedoch noch nicht abgeschlossen und bedürfen einer weiteren Bearbeitung. Nach den bisherigen Ergebnissen sind die unterschiedlichen Befunde im Fall der größeren Stickstoffgabe (2 N) so zu deuten, daß durch die höhere Stickstoffzufuhr ein stärkeres Mikroorganismenwachstum eintritt; dies geht auch aus dem rascheren Abbau der organischen Substanz hervor. Dadurch treten durch die Autolyse der größeren Anzahl von Mikroorganismen auch größere Mengen an Aminosäuren und wasserlöslichen Peptiden auf. Die geringere Menge an Ligninabbauprodukten spricht dafür, daß während der ablaufenden Oxydationsreaktionen stickstoffhaltige Verbindungen, wie Aminosäuren, in zunehmendem Maße mit den Ligninabbauprodukten zu unlöslichen Produkten kondensieren. Für diese Überlegung kann noch ein weiterer Befund herangezogen werden. Der in dem extraktfreien Material vorhandene Methoxylgehalt befindet sich mit zunehmender Verrottung in immer geringerem Maße in den Ligninfraktionen. Hierauf wird später nochmals

eingegangen. Es sei auch darauf hingewiesen, daß auch in den Aetherextrakten die gleichen Ligninabbauprodukte wie in den Extrakten mit heißem Wasser gefunden worden sind [6].

Eine ausführlichere Untersuchung ist mit dem „extraktfreien" Material durchgeführt worden. In dieser Fraktion befinden sich alle schwerer löslichen, darunter auch die höhermolekularen Anteile.

Aus den Diagrammen (Bild 5) ist zu ersehen, daß die Abnahme des extraktfreien Materials zur Hauptsache durch die Abnahme der Holozellulose bedingt ist. Die prozentuale Abnahme der Ligninfraktionen bezogen auf das Ausgangsmaterial nähert sich einem Endwert. Die Geschwindigkeit der Erreichung dieses Endwertes ist von

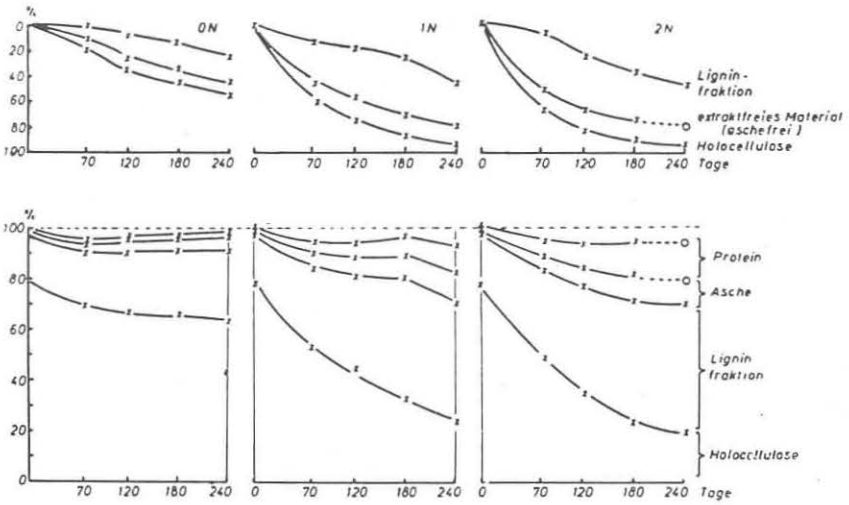

Bild 5. Abnahme des extraktfreien Materials und der darin enthaltenen Ligninfraktion und der Holozellulose in Prozent des Ausgangsmaterials. Zusammensetzung des extraktfreien Materials aus gewonnenen Lignin, Holozellulose, Asche und berechnetem Protein (org. N-extraktfreies Material minus N-Lignin) × 6.25

der Menge an zugegebenen Stickstoffsalzen abhängig. Die ausgewogenen Mengen an Holozellulose, Lignin, Asche und berechnetem Protein betragen ca. 95 bis 97% des vorher bestimmten extraktfreien Materials.

Weitere Versuche haben ergeben, daß unter den vorliegenden Bedingungen ein Zusatz von Holozellulose zu den Rotteansätzen im Verlauf der Rotte keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Gewichtsabnahme der Ligninfraktion ausübt, sondern, daß diese nur von der Menge an verfügbarem Stickstoff abhängt [7]. Wird jedoch gegen Ende der Zersetzung noch Stickstoff hinzugefügt, so findet ein verstärkter Abbau der Ligninfraktion statt. Es treten jedoch Veränderungen in deren Zusammensetzung ein, die sich in einer Erhöhung des prozentualen Kohlenstoffgehaltes und in einer Verminderung des prozentualen Sauerstoffs-, aber besonders des Stickstoffgehaltes äußern [4]. Diese Beobachtungen sind wichtige Anhaltspunkte für Untersuchungen über die Umwandlung von Lignin in Humusstoffe und bedürfen einer weiteren Bearbeitung.

Die Anzahl Gramm an Kohlenstoff und Methoxyl nimmt im Verlauf der Rotte ab (Bild 6). Einen Überblick über die Veränderung am Ligninmolekül ergibt die Zusammenstellung in Grammatom, wobei die Anzahl Wasserstoffatome am stärksten abnimmt. Die Anzahl Kohlenstoffatome nimmt zwischen 70 und 180 Tagen fast in gleicher Weise wie die der Wasserstoffatome ab (Beispiel 2 N). Dieser Befund spricht dafür, daß vornehmlich die Seitenketten des Ligninmoleküls abgebaut werden. Hierfür spricht auch die geringe Verminderung der Anzahl der Sauerstoffatome.

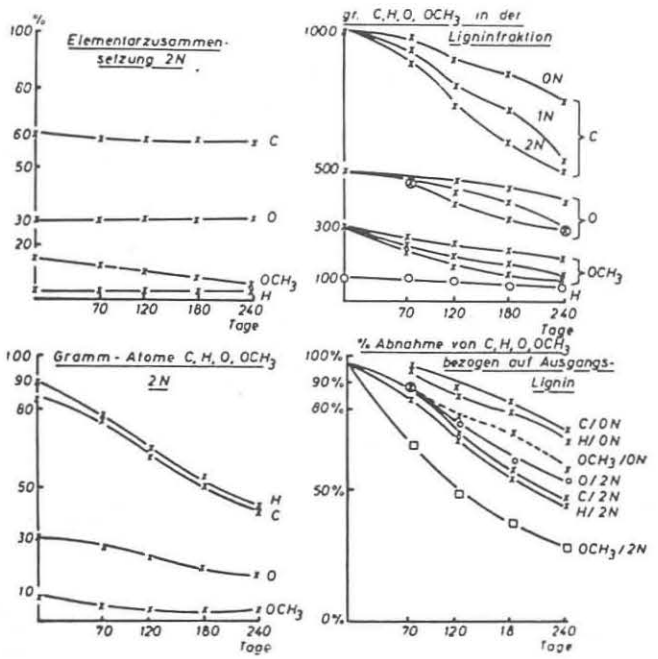

Bild 6. Veränderungen der Ligninfraktionen von Roggenstroh im Verlauf der Rotte in bezug auf C, H und O

Die Differenzen der Anzahl Grammatome an C, H und O in den Ligninfraktionen zu verschiedenen Zeiten der Rotte lassen sich aus den angegebenen Werten berechnen. Diese Differenzen setzen sich zusammen aus:

a) den abgespaltenen Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Sauerstoffatomen und

b) den Sauerstoffatomen, die während der Oxydation der Ligninfraktionen aufgenommen werden und den Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Sauerstoffatomen, die durch die Kondensation stickstoffhaltiger Verbindungen bei den Ligninfraktionen hinzukommen.

Die Gewichtsverluste in den Ligninfraktionen sind jedoch wesentlich größer als die hinzukommenden Mengen an stickstoffhaltigen Verbindungen: die folgende Zusammenstellung gibt hierfür 2 Zahlenbeispiele.

So beträgt im Falle von 2 N der Gewichtsverlust der Ligninfraktion von 0 bis 240 Tagen 761 bzw. von 70 bis 240 Tagen 647 g, die Zunahme bzw. Abnahme des errechneten Proteins 44 bzw. 36 g. Die Berechnung des Stickstoffs in den Lignin-

	g-Lignin-fraktion		Zunahme an Protein ber. aus Zunahme N × 6,25		g-Lignin-fraktion		Abnahme an Protein ber. aus Zunahme N × 6,25
0 T	1582 g	240 T/2 N	96 g	70 T/2 N	1468 g	240 T/2 N	69 g
240 T/2 N	821 g	0 T	52 g	240 T/2 N	821 g	70 T/2 N	132 g
	761 g		44 g		647 g		—36 g

fraktionen als Protein ist nicht vollkommen richtig, da nur ein Teil des Stickstoffs nachgewiesenermaßen als α-Aminostickstoff vorliegt [4]. Die Zunahme bzw. Abnahme von 44 bzw. 36 g Protein beträgt jedoch nur ca. 6% von der Abnahme der Ligninfraktion. Die Proteinwerte haben daher keinen großen Einfluß auf die Differenzen an Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Sauerstoffatomen. Berechnet man nun die Zusammensetzung der abgespaltenen Gramm-Atome an Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff bzw. Methoxyl im Durchschnitt aller Versuche bei den unterschiedlichen Stickstoffgaben und während der verschiedenen Rottezeiten, so kommt man dazu, daß auf zwei Strukturelemente von Lignin mit der angenommenen Summenformel $(C_{10}H_{11}O_3)_x \cdot (^1/_2\,H_2O)_x$ die abgespaltenen Elemente eine Summenformel von $C_6H_{7,5}O_2$ besitzen.

Diese Anzahl C-, H-, O-Atome könnte man entsprechend Bild 7 verteilen.

Zur Erklärung der Verminderung der Atome C, H und O reichen die gemachten Berechnungen, insbesondere gegen Ende der Rotte, jedoch nicht aus. Zieht man z. B. zur Berechnung die Werte für 240 Tage/2 N heran, so kann man aus der Abnahme der Ligninfraktion in Prozent und der Abnahme durch Abspaltung der Kohlenstoff-, Wasserstoff-, Sauerstoffatome berechnen, daß der Gewichtsverlust an Lignin zu $^2/_3$ auf die Abspaltung der Seitenkette und zu einem Drittel auf Ringspaltung zurückzuführen ist. Hierbei wird die Annahme gemacht, daß die Spaltprodukte in Äther und Wasser löslich sind.

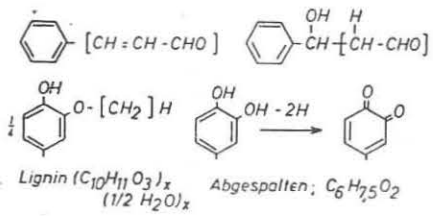

Bild 7. Verteilung der C-, H- und O-Atome

Nach den bisherigen Erfahrungen scheint die Zersetzung des Lignins zu Anfang mehr durch Abspaltung der Seitenketten und Entmethylierung als durch Ringaufspaltung zu erfolgen. Letztere tritt mit zunehmender Rottezeit in verstärktem Maße ein. Diese Annahme wird auch durch Untersuchungen an Modellsubstanzen (8, 9, 10, 11) gestützt.

Auffällig ist die starke prozentuale Abnahme der Methoxylgruppen in allen Versuchen. Die Zunahme des Sauerstoffgehaltes spricht dafür, daß das Ligninmolekül während der Zersetzung einer laufenden Oxydation unterworfen ist. Aus den Analysen geht hervor, daß im Laufe der Zersetzung die Ligninfraktionen einen stärker aromatischen Charakter annehmen. Damit ist jedoch nicht gesagt, daß die Zersetzungsvorgänge so verlaufen, daß die entstehenden Produkte Polymere von einer einheitlicheren chemischen Zusammensetzung sind als das Ausgangsmaterial.

Die Veränderung der Ligninfraktion ist mit dem Einbau von Stickstoff verbunden.

Der prozentuale Stickstoffgehalt der Ligninfraktionen des Versuches ohne Stickstoffzusatz ändert sich im Laufe der Rotte fast nicht; er steigt von 0,53% im Ausgangsstroh auf 0,56% in der Ligninfraktion 240 Tage/0 N an (Bild 8). Bei der Zugabe von Stickstoffsalzen nimmt der prozentuale Stickstoffgehalt laufend zu und fällt nach längerer Rottezeit wieder etwas ab. Der prozentuale Gehalt hängt von den Ausgangsmaterialien und den Bedingungen, unter denen die Zersetzung verläuft, ab; im Prinzip zeigen jedoch alle Versuche den gleichen Verlauf.

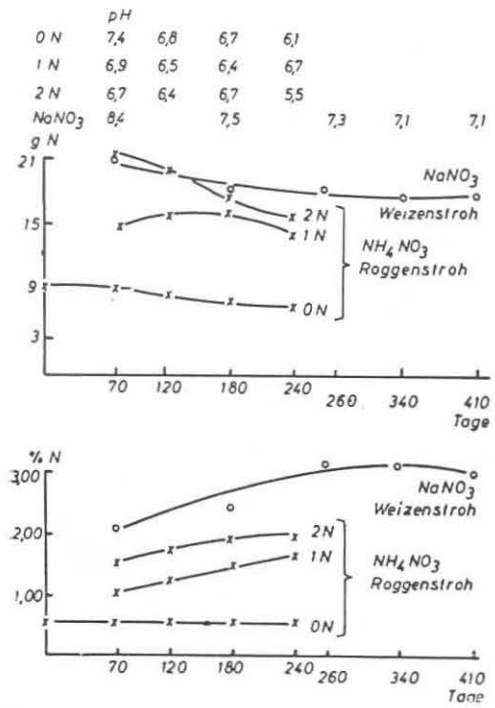

Bild 8. Stickstoffgehalt der Ligninfraktionen und Prozent und in Gramm bei verschiedenen Stickstoffaufgaben und zu verschiedenen Rottezeiten

Die Anzahl Gramm Stickstoff in den Ligninfraktionen nimmt bei den Versuchen mit Zusatz von Stickstoffsalzen im Laufe der Rotte ab; die Abnahme ist im Laufe der Rotte um so größer je höher die anfängliche Stickstoffgabe war. Die Veränderungen im Gehalt an Stickstoff sind zur Zeit des intensiven Abbaus der Holozellulose, d. h. zur Zeit der stärksten Mikroorganismentätigkeit am größten.

Im Durchschnitt aller Versuche sind 90% des gesamten Stickstoffs in den Rotteprodukten organisch gebunden, während ca. 30% des gesamten Stickstoffs bei allen Versuchen in der jeweiligen Ligninfraktion vorhanden sind; die Werte des Versuchs ohne Stickstoffzusatz liegen etwas höher. Der anorganische Stickstoff, bestimmt als Nitrat- und Ammoniumstickstoff, beträgt im Durchschnitt 10% (Bild 9).

Es sollen noch einige Regelmäßigkeiten erwähnt werden.

Bei der Division einmal von Gramm org. N-Gesamttrockensubstanz und zum anderen von Gramm N-extraktfreiem Material durch Gramm N-Lignin schwanken die Werte jeweils um einen Mittelwert. Dies besagt im ersteren Fall, daß zwischen dem Stickstoffgehalt der Gesamttrockensubstanz und dem im Lignin eingebauten Stickstoff eine Beziehung besteht. Im zweiten Fall bedeutet der nahezu gleiche Quotient, daß die wasserlöslichen Verbindungen immer in Abhängigkeit des Stickstoffgehaltes der Gesamttrockensubstanz in gleicher Menge auftreten.

Der Quotient aus Gramm Stickstoff im extraktfreien Material und Gramm Stickstoff im Lignin zeigt dagegen bei den verschiedenen Stickstoffgaben eine steigende

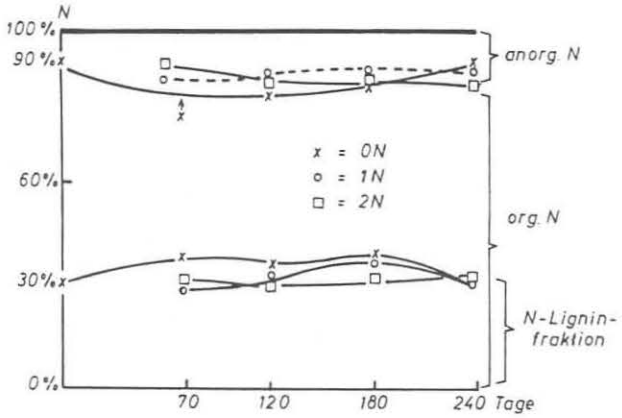

Bild 9. N-Bilanz der Rotteansätze ohne und mit Ammoniumnitrat als Stickstoffquelle in Prozent

Tabelle 2. Beziehung der Stickstoffmengen in den einzelnen Bestandteilen in Gramm

	0 T	⌀ 0 N	⌀ 1 N	⌀ 2 N	⌀ 0 N, 1 N, 2 N
$\frac{\text{g org. N-Ges. Tr. Subst.}}{\text{g N-Ligninfraktion}}$	3,22	2,94	3,12	3,25	3,07 ± 0,118
$\frac{\text{g org. N-Ges. Tr. Subst.}}{\text{g N-extraktfr. Material}}$	1,64	1,17	1,11	1,18	1,15 ± 0,581
		0N/70—240 T	1 N (70) 120—240 T		2N/70—180T
g N-extraktfr. Mat.	1,98	2,08—2,66	(3,09) 2,77—2,91		2,53—2,96

Tendenz. Dieser Befund kann damit gedeutet werden, daß mit zunehmender Rotte die Eiweißverbindungen in dem extraktfreien Material zunehmen, z. B. können sich aus den niedermolekularen Anteilen in zunehmender Menge Kondensationsprodukte aus Ligninabbauprodukten und Aminosäuren bzw. Peptiden bilden.

Die Größe des Quotienten aus Gramm OCH_3-extraktfreiem Material und Gramm OCH_3-Ligninfraktion ist nur von der Rottezeit aber nicht von der Höhe des Stick-

Tabelle 3. Beziehung zwischen den Methoxylgehalten von extraktfreiem Material und der Ligninfraktion

$$\frac{\text{g } OCH_3 \text{ — extraktfreies Material}}{\text{g } OCH_3 \text{ — Ligninfraktion}}$$

0 T	70 T/0 N — 2 N	120 T/0 N — 2 N	180 T/0 N — 2 N	240 T/0 N — 2 N
1.04	1.07	1.15	1.26	1·47

stoffzusatzes abhängig. Zu Beginn der Rotte liegt er nur wenig über 1. Daraus ist zu ersehen, daß der OCH_3-Gehalt des extraktfreien Materials aus dem Lignin stammt. In dem extraktfreien Material dürfen nach Vorbehandlung mit Äther und heißem Wasser von den Ligninanteilen auch nur noch die höhermolekularen Bestandteile enthalten sein.

Mit zunehmender Verrottung des Strohs nimmt der Quotient bei allen drei Stickstoffgaben in gleicher Weise zu, wobei die Differenzen zwischen 70 und 180 sowie zwischen 70 und 240 Tagen außerhalb der Fehlergrenzen liegen. Dieser Befund besagt, daß gegen Ende der Verrottung ein Drittel der Methoxylgruppen in dem extraktfreien Material nicht an der Ligninfraktion gebunden ist. Es können sich aus Ligninabbauprodukten, die Methoxylgruppen enthalten, und aus stickstoffhaltigen Verbindungen unlösliche Produkte gebildet haben. Solche entstehen durch Kondensation aus den Ligninabbauprodukten und Aminosäuren bzw. Peptiden; diese Verbindungen werden bei der Anwendung von Schwefelsäure zur Isolierung der Ligninfraktionen wenigstens zum Teil gespalten, sonst würde der Quotient mit zunehmender Rottezeit nicht ansteigen.

Tabelle 4

$\frac{\text{g-Atome } OCH_3}{\text{g-Atome N}}$ in den Ligninfraktionen

	0 T 14,5		
	0 N	1 N	2 N
70 T	13,2	6,3	4,0
120 T	12,3	4,6	2,8
180 T	11,7	3,4	2,8
240 T	10,8	3,1	2,5

Mit zunehmender Zersetzung des Lignins nimmt mit steigenden Stickstoffgaben die Anzahl der Methoxylgruppen pro Stickstoffatom ab.

Diese Werte können als Maß für das Fortschreiten der Umwandlung des Lignins angesehen werden. So entspricht die Umwandlung des Lignins aus dem Ansatz 240 T/1 N ungefähr der von 120 bis 180 Tagen/2 N. Durch die erhöhte Zugabe an Stickstoffsalzen ist ein stärkeres Mikroorganismenwachstum bedingt. Die Entmethylierung scheint dadurch in verstärktem Maße zu erfolgen. Je nach der Höhe der Stickstoffgaben erfolgt eine verstärkte Umsetzung des umgewandelten Lignins mit organischen Stickstoffverbindungen.

Die bisherigen Daten lassen nur einige wenige Aussagen über die chemischen Veränderungen der Ligninfraktionen und den Einbau von Stickstoff in diese zu. Wir versuchten daher mittels Infrarotspektren weitere Erkenntnisse zu gewinnen.

Die Infrarotspektren der Ligninfraktionen aus Rottestroh, dem keine Stickstoffsalze zugesetzt worden sind, zeigen am wenigsten auffällige Unterschiede und sind denen des Lignins des Ausgangsmaterials ähnlich. Bei Zunahme des Stickstoffgehaltes der Ligninfraktionen tritt eine breitere Bande im Bereich von 6,10 bis 6,20 μ und einer solchen im Bereich von 5,85 bis 6,00 μ auf, wovon erstere Aminen

zugeordnet werden kann. Die Bande im kürzerwelligen Bereich kann durch verschiedenartige Carbonylgruppen verursacht werden. Je höher der Stickstoffgehalt, desto deutlicher sind die Veränderungen dieser Banden (Bild 10). Vergleicht man zwei Ligninfraktionen mit gleichem Stickstoffgehalt wie 70 T/2 N mit 180 T/1 N mit 1,45 bzw. 1,49% N, so decken sich die Kurven. Das gleiche gilt auch für 180 T/2 N und 240 T/1 N.

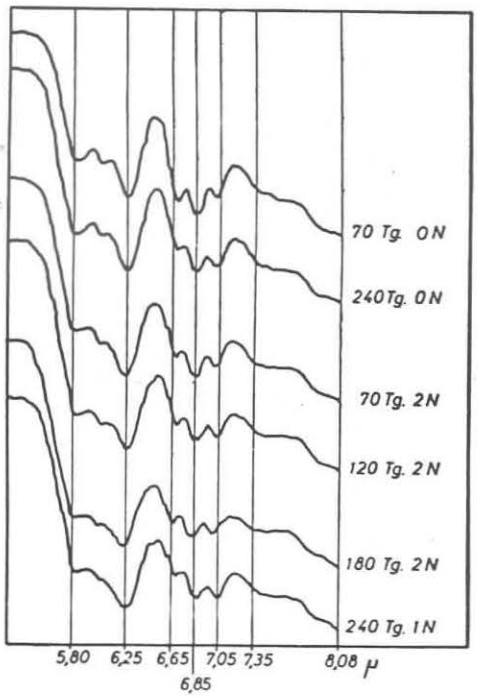

Bild 10. Infrarotspektren von Ligninfraktionen verschiedener Rottezeit im Bereich von 5.5 bis 7,5

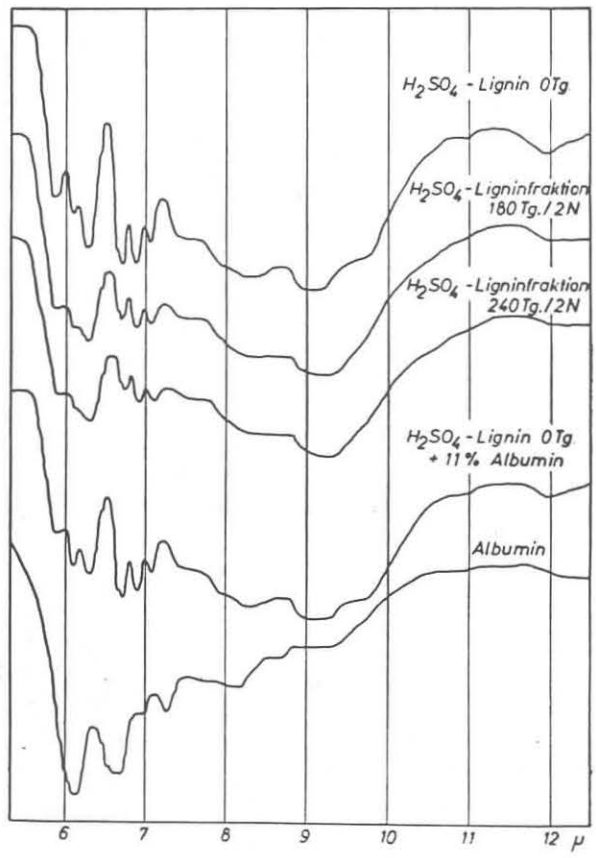

Bild 11. Vergleich der Spektren von Ligninfraktionen zu verschiedener Rottezeit mit Gemischen aus Lignin und Albumin

Mit zunehmender Rottezeit treten in zunehmendem Maße Veränderungen in dem Spektralbereich von 6,25 bis 7,5 μ auf. Die Banden 6,25 μ und 6,67 μ (aromatische C—C-Bindung) verbreitern sich mit zunehmender Rottezeit immer mehr. Die Stärke der Absorption bleibt jedoch nahezu unverändert. Dies spricht dafür, daß [illegible]omatische Charakter nicht abnimmt, sich aber aus immer mehr unter[illegible]abstituierten Verbindungen zusammensetzt; hierdurch wird auch die Untergrundabsorption immer größer.

Das gleiche gilt für die Bande 6,85 μ (asymmetrische CH-Deformationsschwingung) und für die Bande bei 7,05 μ (symmetrische CH-Deformationsschwingung). Der letztere Befund kann mit dem Abbau der Seitenkette erklärt werden. Die Spektren stimmen mit den chemischen Befunden überein. Zusätzlich kann aus den Spektren entnommen werden, daß die Reaktionen bei der Umwandlung des Lignins zwar in gleicher Art, aber in Abhängigkeit von der Höhe des Zusatzes an Stickstoffsalzen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit abzulaufen scheinen.

Mischungen von Ligninpräparaten mit 10% Albumin lassen den Albumingehalt noch nicht erkennen. Errechnet man aus dem Stickstoffgehalt der Ligninfraktion den Proteingehalt, so beträgt dieser bei 240 T/2 N maximal 12%. Da sich aber die IR-Spektren der Ligninfraktionen mit deren Stickstoffgehalt verändern, besteht somit die Möglichkeit einer Reaktion zwischen den im Laufe der Verrottung veränderten Ligninanteilen und Protein bzw. Aminosäuren. Auf jeden Fall sind die verschiedenen Mischungen keine mechanischen Mischungen aus Lignin und Protein (Bild 11).

Die Rolle des Lignins bei der Bildung von Humusstoffen kann einmal darin bestehen, daß die Veränderungen an dem höhermolekularen Lignin ablaufen, und zum anderen, daß das Lignin zuerst in Abbauprodukte zerlegt wird.

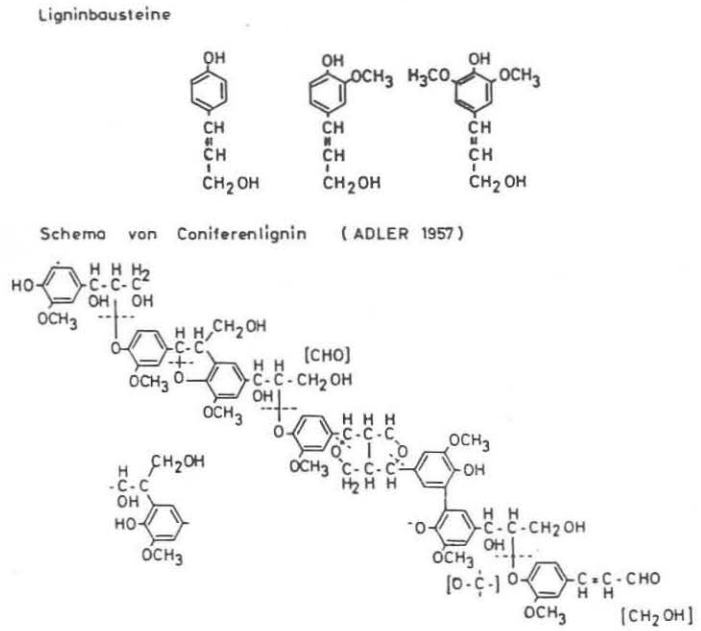

Bild 12. Ligninbausteine und Schema des Koniferenlignins

Auf Grund der bisherigen Erkenntnisse hat E. Adler [12] ein Strukturschema des Koniferenlignins aufgestellt, dessen Baustein fast ausschließlich Koniferylalkohol ist. Die Oxydation mit m-Nitrobenzolsulfosäure ergibt für das Lignin im Roggenstroh auf Grund der abgetrennten Oxydationsprodukte eine Zusammensetzung aus 2.5 Mole-

külen Koniferylalkohol, 2 Molekülen p-Hydroxyzimtalkohol und einem Molekül Sinapinalkohol als Bausteine; die Elementaranalyse ergab die Summenformel $(C_{10}H_{9,8}O_{3,2} \cdot 0{,}5\ H_2O)_x$ (Bild 12).

Die erste von den erwähnten Möglichkeiten ist die, daß an dem höhermolekularen Lignin selbst oder an noch verhältnismäßig großen Bruchstücken die Demethylierung und der Einbau von stickstoffhaltigen Verbindungen wie Peptiden oder Aminosäuren oder deren Abbauprodukten vor sich geht. Der Beginn dieser Reaktion im Verlaufe der Verrottung von Stroh ist beschrieben worden.

Die zweite Möglichkeit ist die, daß die Huminstoffe aus den Ligninabbauprodukten nach erfolgter Demethylierung und Oxydation durch Kondensation mit stickstoffhaltigen Verbindungen entstehen.

Aus den Rotteprodukten lassen sich mittels Extraktion mit heißem Wasser die Ligninabbauprodukte Vanillinsäure, Ferulasäure, p-Hydroxyzimtsäure, Vanillin und p-Hydroxybenzaldehyd in allen Stadien der Verrottung nachweisen [13]. Aus dem Vergleich des Methoxylgehaltes des extraktfreien Materials und dem der Ligninfraktionen ging auch hervor, daß sich im extraktfreien Material Kondensationsprodukte aus Ligninabbauprodukten mit Peptiden bzw. Aminosäuren befinden können. Die extraktfreien Materialien nehmen mit zunehmender Verrottung und zunehmendem Stickstoffgehalt eine immer dunklere Färbung an, die am Ende schwarzbraun und den Huminsäuren ähnlich ist.

Von verschiedenen Seiten [8, 9, 10, 11] ist festgestellt worden, daß Lignane, z. B. α-Conidendrin oder Ligninabbauprodukte durch Mikroorganismen des Bodens, wie Pseudomonas- oder Flavobakterien, demethyliert werden. Bei α-Conidendrin findet zuerst eine Spaltung des Moleküls statt. Haben die Ligninabbauprodukte eine Seitenkette mit 3 Kohlenstoffatomen, so wird diese zunächst bis zu einer Carboxylgruppe aboxydiert, und erst dann erfolgt die Demethylierung zu Polyphenolen. Bei Monophenolverbindungen, wie p-Hydroxybenzoesäure, kann durch einen anderen Oxydasentyp (mixed function oxydases) eine Hydroxylgruppe meist in o–Stellung eingeführt werden.

Uns interessierte, in welcher Weise die Oxydation von partiell methylierten o–Diphenolen oder von diesen selbst durch Laccasen katalysiert wird. Zu diesem Zweck ist aus der Kultur des *Basidiomyceten*, *Polystictus versicolor*, eine Laccase isoliert und über mehrere Stufen gereinigt worden [14].

Im Falle von Vanillinsäure und Vanillin konnten verschiedene Oxydationsprodukte, darunter Methoxy-p-benzochinon (I), die beiden Dimeren der Ausgangsverbindungen (II, III) und 6,6′-Dimethoxy-di-p-benzochinon- 2,2′ (IV) gefaßt werden. Als höhermolekulare Produkte sind jedoch nur hellgefärbte Dehydrierungspolymerisate erhalten worden (Bild 13).

Die Oxydation von 1,2-Diphenolen, wie Brenzcatechin und Protocatechusäure führt in Gegenwart des Laccasepräparates zu dunkelgefärbten, stickstoffhaltigen Produkten, die in ihren Eigenschaften den Huminsäuren ziemlich ähnlich sind. Auch hier gelang es, einige Zwischenprodukte zu erhalten. Durch reduzierende Azetylierung ist Hydroxy-p-benzochinon (V) nachgewiesen und 5,5′-Dihydroxy-di-p-benzochinon-2,2′ (VI) isoliert worden (Bild 14).

Um den Verlauf dieser Reaktion besser verfolgen zu können, ist mit markierten Verbindungen gearbeitet worden. So entstehen die dunkelgefärbten Produkte bei der Oxydation von Protocatechusäure durch Einbau des Enzymeiweißes unter teilweiser Abspaltung von Kohlendioxyd, wie durch Markierung der Carboxylgruppe mit ^{14}C nachgewiesen werden konnte [15].

Die Abnahme des Gehaltes der Ligninfraktionen findet auch dadurch statt, daß eine Ringspaltung bei der Oxydation der Ligninabbauprodukte auftritt.

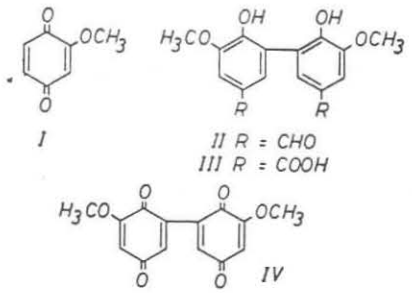

Bild 13. Oxydationsprodukte von Vanillinsäure und Vanillin

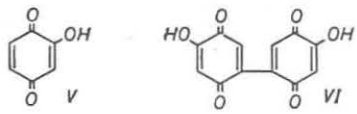

Bild 14. Oxydationsprodukte von Protocatechusäure

In weiteren Untersuchungen ist diese bei der Oxydation von Protocatechusäure mit gereinigten Enzympräparaten, in diesem Falle Sauerstofftransferasen, untersucht worden. Diese verläuft nicht über eine Chinonzwischenstufe, sondern der Sauerstoff wird an einer Doppelbindung des Ringes addiert.

Die Rolle des Lignins bei der Bildung von Humusstoffen ist auf Grund der vielen Möglichkeiten der dabei ablaufenden Reaktionen noch nicht eindeutig bestimmbar. Verschiedene Wege zu deren Untersuchung sind beschrieben worden. Als Beispiel hierfür ist Lignin aus Getreide gewählt worden. Die aufgezeigten Methoden lassen sich jedoch auf die Untersuchungen anderer ligninhaltiger Materialien, so auch auf Torf übertragen. Auf Grund der Unterschiede in der Zusammensetzung des Ausgangsmaterials werden die Befunde Abweichungen zeigen.

Literatur

[1] Broadbent, F. E.: Modification in chemical properties of straw during decomposition. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. **18**, 2 (1954).
[2] Beutelspacher, H., und C. Nigro: Unveröffentlicht.
[3] Waksman, S. A., und Tenney, F. G.: The composition of natural organic materials and their decomposition in the soil; I. Methods of quantitative analysis of plant materials. Soil Sci. **24**, 275 (1927).
[4] Flaig, W., Schobinger, U., und Deuel, H.: Umwandlungen von Lignin in Huminsäuren bei der Verrottung von Weizenstroh. Chem Ber. **92**, 8, 1973 (1959).
[5] Flaig, W., und Maeder, H.: Unveröffentlicht.
[6] Maeder, H.: Chemische und pflanzenphysiologische Untersuchungen mit Rottestroh. Dissertation, Gießen 1960.
[7] Flaig, W., Saalbach, E., und Rusch, R.: Unveröffentlicht.

[8] HENDERSON, M. E. K.: Metabolism of methoxylated aromatic compounds by soil fungi. J. Gen. Microbiol. **16**, 686 (1957).
[9] KONETZKA, W. A., PELCZAR jr., M. J., und GOTTLIEB, S.: Microbiol. dissimilation of methoxylated aromatic compounds. Bacteriol. Proc. **1957**, 85.
[10] TABAK, H. H., CHAMBERS, C. W., und KABLER, P. W.: Bacterial utilization of lignans. J. Bact. **78**, 469 (1959).
[11] WOODINGS, E. T., und KONETZKA, W. A.: Amerikanischer Mikrobiologenkongreß St. Louis 1959.
[12] ADLER, E.: Newer views of lignin formation. Tappi **40**, 294 (1957).
[13] FLAIG, W.: Chemie der Humusstoffe. Suomen Kemistilehti **A 33**, 229 (1960).
[14] FLAIG, W., und HAIDER, K.: Reaktionen mit oxydierenden Enzymen aus Mikroorganismen. Planta Medica **9**, 123 (1961).
[15] FLAIG, W., und HAIDER, K.: Die Verwertung phenolischer Verbindungen durch Weißfäulepilze. Arch. Mikrobiol. (im Druck).

Diskussion

Dr. GORDON, *Langenhagen/Hann.:*

Herr Prof. FLAIG hat schon auf die Zusammenhänge hingewiesen, die zwischen diesen generellen Untersuchungen, die die Zersetzung des Torfes betreffen, und allen anderen Substanzen bestehen. Ich glaube, daß wir uns als Torfleute doch alle darüber im klaren sind, den Torf im Zustand einer bestimmten Zersetzung zu gewinnen und diese bei der Nutzung des Torfes durch Zugabe von anderen Stoffen sehr stark zu beeinflussen versuchen. Es ist für uns interessant, zu wissen, welcher Art diese Beeinflussung ist. Besonders wenn wir an eine Nutzung des Torfes nach einer chemischen Veränderung denken, müssen wir an die Untersuchungen anknüpfen, die hier angeführt wurden, weil wir ja bestimmte unterbrochene Veränderungen dann wieder neu in Gang bringen wollen.

Dr. PREU, *Freiberg (Sa.):*

Wir beschäftigen uns in Freiberg mit der Chemie der Xylite. Obgleich wir eigentlich dabei ganz andere Ziele verfolgen, glaube ich doch, daß unsere Arbeiten auch in diesem Zusammenhang ganz interessant sind. Wir haben allerdings, im Gegensatz zu Ihnen, Herr Prof. FLAIG, sehr harte Aufschlußbedingungen gewählt, indem wir die Xylite einer Druckkochung in Gegenwart von Natronlauge unterwerfen, so daß ein Vergleich nicht unmittelbar möglich ist.

Wenn wir einen Xylit mit einer etwa 8%igen Natronlauge bei verschiedenen Temperaturen im Autoklaven behandeln und dann nach Abtrennung des unlöslichen Rückstandes die verbleibende alkalische Lösung mit Salzsäure ausfällen, bekommen wir ein Produkt, das wir als Alkalilignin oder, wenn Sie wollen, auch als Huminsäure bezeichnen. Wir wollen einen Xylit wählen, dessen analytisch bestimmter Ligningehalt bei etwa 50% liegt. Mit steigender Aufschlußtemperatur vergrößert sich auch die fällbare Alkalilignin menge, obwohl sich deren elementare Zusammensetzung dabei kaum ändert. Es werden also dabei im wesentlichen gleiche Stoffe in alkalilösliche Form übergeführt. Dies mag einmal auf rein kolloid-chemischen Vorgängen beruhen, andererseits tritt aber bei der alkalischen Druckkochung auch eine Spaltung der Ätherbrücken des Lignins auf, wie wir ultrarotspektrographisch nachweisen konnten. Hierdurch wird die Zahl hydrophiler Gruppen erhöht und somit eine verstärkte Löslichkeit in Alkali erklärlich. Verständlicherweise geht dabei die Menge des unlöslichen Rückstandes zurück, so daß bei einer Behandlung ab etwa 200 °C der gesamte Xylit alkalilöslich wird. Erst bei vielstündigem Kochen bei etwa 270 °C tritt wieder eine geringere Menge eines alkaliunlöslichen Rückstandes auf.

Bei der von uns gewählten Endtemperatur von 270 °C finden wir fast dieselbe Menge Alkalilignin, also wieder etwa 50%, die wir nach KLASON als Säurelignin bestimmt haben. Hieraus könnte man einen Widerspruch zu Ihren Ergebnissen sehen, nach denen bei höherer

Beanspruchung ein wesentlicher Anteil des Lignins zersetzt wird. Auch uns erschien dieses Ergebnis zweifelhaft, und wir kamen zu der Vermutung, daß gewisse Spaltprodukte mit den Abbaustoffen des Lignins reagiert haben müssen.

Aus diesem Grunde haben wir folgenden Versuch gemacht: Zunächst wurde eine Kochung bis 170 °C vorgenommen und danach die Zellulose abgetrennt. Hierbei wird diese nur wenig angegriffen; denn es ist ja die übliche technische Aufschlußtemperatur für die Natronzellstoffgewinnung. Wenn wir nun bei 270 °C weiterkochen, erhalten wir nach der Säurefällung nur etwa 35%, also bedeutend weniger Alkalilignin als bei einer Behandlung des gesamten Xylits. Hieraus ist zu schließen, daß irgendwelche Spaltprodukte der Zellulose im ersten Fall mit in die Reaktion eingehen. Durch Äther können aus der verbleibenden wäßrigen Alkalilösung etwa 15% ätherlösliche Bestandteile isoliert werden. Diese haben den Charakter von mehrwertigen Phenolen, vorzugsweise Brenzkatechin. Wir haben nunmehr den gleichen Versuch wiederholt, jedoch nach Abtrennung der Zellulose Stoffe zugesetzt, die mit Phenolen reagieren und deren Bildung aus Zellulose möglich ist. Nach Zusatz von Formaldehyd bzw. Azeton zur zellulosefreien alkalischen Xylitlösung und Erhitzen auf 270 °C erhielten wir eine Alkalilignin menge, die etwa der gleichen entsprach, wie wir vorher bei Kochungen des gesamten Xylits bei gleicher Temperatur erhalten hatten. Darüber hinaus hatte sich noch eine größere Menge alkaliunlöslicher Stoffe als zuvor gebildet.

Wir nehmen an, daß sich hierbei ähnliche Reaktionen abspielen, wie sie uns aus der Phenolharzchemie bekannt sind. Über Phenolmethylole kommt es zu säurefällbaren Stoffen mit Methylen- oder Methylenäther-Brücken und schließlich zu vollkommen unlöslichen Körpern chinoider Struktur nach Art der Chinonmethide nach HULTZSCH. Solche Reaktionen halten wir auch bei der natürlichen Inkohlung für wahrscheinlich, und wir glauben daher bei der Bildung der Huminstoffe auch an eine Mitwirkung gewisser Spaltprodukte der Zellulose.

Prof. Dr. NIKLEWSKI, *Szczecin (Polen):*

Bei welchen Temperaturen haben Sie die Versuche durchgeführt?

Prof. Dr. FLAIG, *Braunschweig:*

Bei 30 °C.

Prof. Dr. FLAIG, *Braunschweig:*

Die Ausführungen von Herrn Dr. Preu waren sehr interessant, insbesondere haben mich die Kurven sehr interessiert. Die Bedingungen bei den angewandten Temperaturen und bei der Anwendung von starkem Alkali weichen ziemlich stark von den physiologischen ab. Wir haben Oxydationen sowohl von verschiedenen Rotteprodukten als auch von Ligninabbauprodukten in alkalischer Lösung durchgeführt und fanden gewisse Unterschiede gegenüber dem biologischen Abbau. Es ist sicher, daß bei höherer Temperatur auch Zellulose einige Veränderungen erfährt, die im Verlauf des biologischen Abbaues nicht auftreten. Insofern muß man Ihnen recht geben, als die Bildung der Humusstoffe aus Lignin nur einer der möglichen Wege ist, und es auch noch andere gibt. In Mikroorganismenkulturen entstehen aus Abbauprodukten von Zuckern oder Zuckern und aliphatischen Aminosäuren oder auch anorganischen Stickstoffquellen in Abhängigkeit der Phenoloxydasenaktivität dunkelgefärbte, den Huminsäuren ähnliche Produkte. Dieser Weg führt über die biologische Bildung von Aromaten im Organismusstoffwechsel.